

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | |
|---|----|--|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : B41M 3/14, G07D 7/00, B42D 15/00, 15/10, C09D 11/00, C09K 9/02, 11/06, G09F 3/00 | A1 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/59731 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 12. Oktober 2000 (12.10.00) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/02905 | | (81) Bestimmungsstaaten: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). |
| (22) Internationales Anmeldedatum: 31. März 2000 (31.03.00) | | (30) Prioritätsdaten: 199 14 702.7 31. März 1999 (31.03.99) DE |
| (71)(72) Anmelder und Erfinder: HAMPP, Norbert [DE/DE]; Schillerstrasse 10, D-35287 Amöneburg-Rosendorf (DE). | | (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): SEITZ, Arne [DE/DE]; Weidenhäuser Strasse 102, D-35037 Marburg (DE). |
| (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE). | | (73) Veröffentlichung <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> |
| (54) Title: METHOD AND PREPARATION FOR THE PHOTOCHROMIC MARKING AND/OR FOR SECURING THE AUTHENTICITY OF OBJECTS | | |
| (54) Bezeichnung: VERFAHREN UND ZUBEREITUNG ZUR PHOTOCHROMEN MARKIERUNG UND/ODER SICHERUNG DER AUTHENTIZITÄT VON GEGENSTÄNDEN | | |
| | | |
| (57) Abstract | | |
| <p>The invention relates to a method and a preparation for the photochromic marking of objects and/or for securing the authenticity of objects. According to the invention bacteriorhodopsins and preparations on the basis of same are applied to the objects. Said preparations preferably permit the use of a combination of low-level and high-level security features.</p> | | |
| (57) Zusammenfassung | | |
| <p>Verfahren und Zubereitung zur photochromen Markierung und/oder zur Sicherung der Authentizität von Gegenständen, wobei Bakteriorhodopsin-Materialien und Zubereitungen daraus zur Applikation auf den Gegenständen verwendet werden, in denen Niedrig- und Hochsicherheitsmerkmale bevorzugt in Kombination verwendet werden.</p> | | |

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|--------------------------------------|----|--|----|-----------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidschan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | ML | Mali | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | MN | Mongolei | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MR | Mauritanien | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MW | Malawi | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MX | Mexiko | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen | | |
| CM | Kamerun | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CN | China | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CU | Kuba | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| CZ | Tschechische Republik | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DE | Deutschland | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| DK | Dänemark | LR | Liberia | SG | Singapur | | |

- 1 -

Verfahren und Zubereitung zur photochromen Markierung und/oder Sicherung der Authentizität von Gegenständen

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Sicherung der Authentizität eines Gegenstandes durch Applizieren einer photochromen Tinte auf den Gegenstand.

- 10 Sicherheitstechnische Anwendungen zur Sicherung der Authentizität von Dokumenten oder Gegenständen umfassen den Einsatz geeigneter Sicherungsmerkmale oder Authentisierungsmarkierungen. Die Verwendung photochromer Materialien für sicherheitstechnische Anwendungen wurde z. B. in US 4 927 180 beschrieben. Das photochrome Identifizierungsmerkmal wird bei den bekannten Beispielen durch den Einsatz von UV-Licht sichtbar gemacht. Als solches ist das verwendete Identifizierungsmerkmal aber nicht oder nur schlecht zu erkennen, so dass die Gefahr besteht, dass der Anwender das Fehlen des Identifizierungsmerkmals nicht bemerkt. Für die Augen des Authentizitäts-Prüfers ist 20 wegen der Verwendung von UV-Licht ein geeigneter Schutz notwendig. Die Verwendung von UV-Licht zur Identifizierung des Sicherheitsmerkmals kann deswegen als unvorteilhaft angesehen werden. Ein ähnlicher Stand der Technik ist in US 5 807 625 dargelegt. Wiederum gelangt hier UV-Licht zur Sichtbarmachung des Sicherheitsmerkmals zum Einsatz.
- 25 Organische photochrome Materialien, die in den genannten Dokumenten offenbart sind, weisen eine typische Schaltzyklenzahl von 10^4 - 10^5 auf. Hierdurch ist die Zahl der möglichen Prüfvorgänge zur Identifizierung des Sicherheitsmerkmals begrenzt. Ein Einsatz für automatisierte Testverfahren, wie z.B. in Geldautomaten oder Zugangskontrolleinrichtungen, ist 30 deshalb für die genannten Sicherheitsmerkmale nicht oder nur bedingt möglich.

- 2 -

Wünschenswert ist weiterhin, eine bestimmte Charge einer Markierungs-
zubereitung identifizieren zu können und z.B. so bei Verlust oder unrecht-
mäßiger Entwendung der für Sicherungszwecke hergestellten Zubereitun-
gen den jeweiligen Ursprung feststellen zu können. Die in den genannten
5 Dokumenten zum Stand der Technik offenbarten Sicherheitsmerkmale
sind für derartige Anwendungen nicht verwendbar.

Konventionelle photochrome Materialien haben außerdem den Nachteil,
dass einer ihrer beiden Schaltzustände keine merkliche Eigenfärbung
10 aufweist.

Eine Aufgabe der Erfindung ist es, ein optisch detektierbares Sicherungs-
merkmal bereitzustellen, bei dem sowohl der Bleich- als auch der Lösch-
vorgang mit Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich durchgeführt
15 werden kann. Solcherart ließe sich ein Farbwechsel mit preiswerten und
überall verfügbaren Lichtquellen, z.B. Leuchtdioden, induzieren. Selbst
mit einfachem Lampenlicht wäre ein Test dann möglich und mit bloßem
Auge detektierbar. Weiterhin wäre es erstrebenswert, ein Sicherungs-
merkmal bereitzustellen, das eine Anzahl von Schaltzyklen aufweist, die
20 über 10^4 - 10^5 liegt.

Eine weitere Aufgabe ist es, eine Vielzahl von einander strukturell ähn-
lichen, photochromen Materialien bereitzustellen, die sich in ihrer Färbung
und/oder ihrem Farbwechsel unterscheiden.

25 Während die im Stand der Technik bekannten Sicherheitsmerkmale
aufgrund des geringen technischen Aufwandes für ihre Überprüfung als
Niedrigsicherheitsmerkmale definiert werden können, besteht eine wei-
tere Aufgabe darin, zusätzlich Hochsicherheitsmerkmale bereitzustellen,
30 deren Überprüfung technisch anspruchsvoll ist und damit dem Laien nicht
möglich ist.

- 3 -

Der Einsatz von Nukleinsäure-Molekülen, insbesondere DNA-Molekülen, die durch geeignete Amplifikationsreaktionen, wie z.B. der PCR-Reaktion mittels spezifischer Primer, detektiert werden können, als unsichtbares Hochsicherheitsmerkmal wird in WO 9806084 offenbart.

5

Gemäß der vorliegenden Erfindung ist es gelungen, ein Material, nämlich Bakteriorhodopsin (BR) zu finden, in dem ein Niedrigsicherheitsmerkmal, wie z.B. die Photochromie, mit einem Hochsicherheitsmerkmal, das z. B. die Identifizierung von Einzelchargen erlaubt, kombinierbar ist und dieses 10 Material zur Markierung bzw. Authentisierung von Gegenständen zu nutzen.

Ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Sicherung der Authentizität von Gegenständen unter Verwendung einer Bakteriorhodopsin enthaltenden 15 Tinte ist in Anspruch 1 angegeben, wobei bevorzugte Weiterbildungen hierzu in den Unteransprüchen dargelegt sind.

Die oben genannten Aufgaben werden erfindungsgemäß durch ein Verfahren zur Sicherung der Authentizität eines Gegenstandes durch 20 Applizieren einer photochromen Tinte auf den Gegenstand gelöst, wobei man eine photochrome Tinte verwendet, die mindestens eine Bakteriorhodopsin-Variante als photochromen Anteil enthält, welche bei Bestrahlung mit Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich eine visuell detektierbare, als Niedrigsicherheitsmerkmal bei einer Authentizitäts- 25 prüfung nutzbare reversible Zustandsänderung, insbesondere Farbänderung, erfährt und die zusätzlich zu dem Niedrigsicherheitsmerkmal ein oder mehrere visuell nicht detektierbare Hochsicherheitsmerkmale aufweist, das oder die nur mit instrumenteller Analytik nachweisbar ist bzw. sind.

30

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit die Verwendung einer photochromen Tinte in einem Verfahren zur Sicherung der Authentizität

- 4 -

eines Gegenstands. Die erfindungsgemäß zu verwendende Tinte enthält als photochromen Anteil mindestens eine Bakteriorhodopsin-Variante. Eine solche BR-Variante liefert sowohl ein zum Zweck einer Authentizitätsprüfung visuell detektierbares Niedrigsicherheitsmerkmal als auch 5 inhärent ein zusätzliches Hochsicherheitsmerkmal, das nur mittels instrumenteller Analytik nachweisbar ist.

- Unter Photochromie versteht man eine durch Licht hervorgerufene reversible Zustandsänderung (insbesondere Farbänderung) eines Stoffes, 10 bei der sich die Farbe (Absorptionsspektrum) des Ausgangsstoffes verändert. Die Rückreaktion kann dann beispielsweise durch Licht anderer Wellenlänge oder durch Wärme ausgelöst werden. Durch die erfindungsgemäß Verwendung einer Bakteriorhodopsin-Variante als photochromen Anteil, welche bei Bestrahlung mit Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich eine Zustandsänderung erfährt, ist eine Bestrahlung mit 15 UV-Licht erfindungsgemäß nicht erforderlich. Dadurch können die mit der Benutzung von UV-Licht verbundenen Nachteile, insbesondere die damit verbundenen apparativen Anforderungen und Schutzmaßnahmen wegge lassen werden.
- 20 Die erfindungsgemäß verwendeten Bakteriorhodopsin-Varianten sind bevorzugt solche, in denen beide, besonders bevorzugt alle Schaltzustände gefärbt sind.
- 25 In einem Aspekt umfasst die Erfindung deshalb ein Verfahren zur Sicherung der Authentizität von Gegenständen, wobei eine photochrome Zubereitung in Form einer Tinte enthaltend Bakteriorhodopsin und/oder eine Bakteriorhodopsin-Variante als photochromen Anteil auf den Gegenstand appliziert wird, wobei die Bestrahlung dieser photochromen Zubereitung mit Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich zu einer Zustandsänderung, insbesondere zu einer Farbänderung, führt, die zum Zwecke 30 einer Authentizitätsprüfung detektierbar ist. Die detektierbare Zustands-

- 5 -

- änderung, insbesondere Farbänderung, ist bevorzugt reversibel, wobei die erfindungsgemäß verwendeten Bakteriorhodopsin-Varianten insbesondere eine Schaltzyklenzahl (also eine Farbänderung zu Prüfzwecken) $> 10^5$, mehr bevorzugt $> 10^6$ und besonders bevorzugt $> 10^7$ aufweisen.
- 5 Dadurch ist eine wiederholte Sicherheitsüberprüfung des authentizitätsgesicherten Gegenstandes anhand des Niedrigsicherheitsmerkmals im Rahmen von Routinemaßnahmen möglich. Wenn die Zustandsänderung irreversibel gemacht wird, z.B. durch Zerstörung des photochrom aktiven Teils des Bakteriorhodopsins, kann die Niedrigsicherheitsmarkierung 10 entwertet bzw. ungültig gemacht werden.

Die Authentizitätsprüfung erfolgt bevorzugt durch Bestrahlung der photochromen Tinte mit sichtbarem Licht, um das Bakteriorhodopsin zu bleichen, wobei die photochrome Tinte daraufhin mit Licht eines zweiten 15 Wellenlängenbereichs bestrahlt wird, um das Bakteriorhodopsin photochemisch in den Ausgangszustand zurückzuführen oder es findet eine thermische Relaxation in den ungebleichten Zustand statt. Die Änderung der optischen Eigenschaften beim Bleich- und/oder Löschvorgang kann mit dem bloßen Auge oder einem optischen Messgerät beobachtet 20 werden.

Als Niedrigsicherheitsmerkmal wird ein Merkmal bezeichnet, dessen Anwesenheit bzw. dessen Fehlen von Laien ohne technische Hilfsmittel auf einfache Weise oder mit geringem technischem Aufwand überprüft 25 werden kann.

Als Hochsicherheitsmerkmal wird hingegen ein Merkmal bezeichnet, wenn das Feststellen seiner Anwesenheit bzw. seines Fehlens dem Laien nicht möglich ist und das üblicherweise nur von Spezialisten mit hohem 30 technischem Aufwand überprüft werden kann.

Niedrigsicherheitsmerkmale sind also Merkmale, deren Analyse geringe Finanzmittel (Pfennigbereich) verbraucht und die von jedermann durchgeführt werden kann, während Hochsicherheitsmerkmale solche Merkmale sind, deren Analyse mehrere hunderttausend DM umfassen kann

5 und die in Labors von Spezialisten durchgeführt werden. Niedrigsicherheitsmerkmale bieten Schutz gegen "Jedermann"-Fälschungstechniken, da Photochromie nicht mit bekannten Techniken reproduzierbar ist.

Hochsicherheitsmerkmale umfassen die Individualisierung der einzelnen Sicherheitsfarben für Anwendungen oder Anwender bis hinab auf den

10 Level der Chargencodierung.

Beispielsweise stellt die Photochromie der Bakteriorhodopsin-Varianten, also die vom Beobachter leicht feststellbare Farbänderung bei Bestrahlung mit sichtbarem Licht, ein Niedrigsicherheitsmerkmal dar. Weitere visuell detektierbare Niedrigsicherheitsmerkmale sind beispielsweise verschiedene Anfangsfärbungen der Bakteriorhodopsin enthaltenden photochromen Tinten, verschiedene Photozyklen oder/und verändertes kinetisches Verhalten.

20 Im Gegensatz zu den Niedrigsicherheitsmerkmalen, die von jedermann auf einfache Weise visuell wahrnehmbar sind, können Hochsicherheitsmerkmale nur mit Hilfe von technisch aufwendigen analytischen Apparaten, also mittels instrumenteller Analytik, überprüft werden. Zur Überprüfung von Hochsicherheitsmerkmalen sind also technische Hilfsmittel erforderlich. So führt beispielsweise die Substitution von Aminosäuren in der Bakteriorhodopsin-Sequenz zu Varianten, deren vom Wildtyp abweichende Masse mittels Massenspektrometrie nachgewiesen werden kann. Es besteht aber auch die Möglichkeit durch Ankopplung von Atomen oder/und Molekülen Bakteriorhodopsin-Varianten zu bilden, die beispielsweise aufgrund ihrer unterschiedlichen Masse, ihres Fragmentierungsmusters oder sonstiger unterschiedlicher Eigenschaften, beispielsweise über ESR oder NMR nachgewiesen werden können.

25

30

- 7 -

- Durch eine Aminosäuresubstitution können insbesondere folgende Hochsicherheitsmerkmale bereitgestellt werden. Bei einer Detektion mit Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie (z.B. ESI) kann eine Änderung der Molekülmasse oder/und eine charakteristische Änderung des Fragmentierungsmusters in der Massenspektroskopie gemessen werden. Durch Detektion mit HPLC und Absorptions- bzw. Fluoreszenzdetektion können charakteristische Änderungen von peptidischen Spaltungen nachgewiesen werden, beispielsweise eine Deletion oder Addition einer Schnittstelle, wodurch sich die Zahl der
- 5 Fragmente erhöht bzw. vermindert. Mit diesen Methoden kann auch eine Änderung der Zahl der aromatischen Aminosäuren nachgewiesen werden. Die Bindung spezifischer monoklonaler Antikörper an die Bakteriorhodopsinsequenz bzw. Abschnitte davon kann mittels ELISA oder ähnlicher Verfahren nachgewiesen werden.
- 10
- 15 Beispiele für Hochsicherheitsmerkmale, die durch Ankopplung erhalten werden, sind Spin-Labels, die mittels ESR nachgewiesen werden können sowie Modifikationen, die mittels stabilen Isotopen (z.B. ^{13}C , ^{15}N) markierten Proteinmodifizierungsreagentien eingeführt werden.
- 20
- 25 Die erfindungsgemäß verwendete photochrome Tinte verleiht nun dem zu sichernden Gegenstand sowohl ein Niedrigsicherheitsmerkmal, wie z.B. die Photochromie als auch ein Hochsicherheitsmerkmal, wie z.B. die Sequenzinformation des verwendeten Bakteriorhodopsins, welches z.B. die Identifizierung von Einzelchargeen erlaubt.
- Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird somit eine doppelte Sicherung der gekennzeichneten Gegenstände erhalten. Während Niedrigsicherheitsmerkmale leicht zu erkennen und damit ohne weiteres und
- 30 schnell nachprüfbar sind, handelt es sich bei den Hochsicherheitsmerkmalen um versteckte Sicherheitsmerkmale, die nur durch aufwendige Analytik festgestellt werden können und von einem potentiellen Nach-

- 8 -

ahmer oder Fälscher möglicherweise gar nicht erkannt werden. Ein potentieller Nachahmer weiß auch zunächst nicht, ob ein bestimmtes Merkmal enthalten sein muss oder nicht, da es eine ganze Reihe von Hochsicherheitsmerkmalen gibt, die mit Bakteriorhodopsin kombiniert
5 werden können.

Diese zusätzliche Sicherung ermöglicht einen hohen Schutz gegenüber Nachahmung und ermöglicht gleichzeitig eine Codierung der Gegenstände, beispielsweise bis hinab zu einer Hersteller- oder Chargen-Codierung.
10 Durch die Verwendung einer Bakteriorhodopsin-Variante sind das Niedrigsicherheitsmerkmal und das Hochsicherheitsmerkmal zudem untrennbar miteinander verbunden, da sie vom gleichen Molekül bereitgestellt werden.

- 15 Die Überprüfung der erfindungsgemäß markierten Gegenstände kann dann auf verschiedene Arten durchgeführt werden. Für eine Routineüberprüfung, wie sie beispielsweise bei jedem Eingang von Geldscheinen in einer Bank oder einem Kreditinstitut durchgeführt werden kann, kann beispielsweise mit einfachen Mitteln nur auf das Niedrigsicherheitsmerkmal geprüft werden. Es ist auch möglich, zwei oder mehrere Niedrigsicherheitsmerkmale parallel zu überprüfen. Für eine eingehendere Untersuchung können dann ein oder mehrere Hochsicherheitsmerkmale der
20 Bakteriorhodopsin-Variante(n) überprüft werden. Das Vorliegen von mindestens zwei Hochsicherheitsmerkmalen kann durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen Bakteriorhodopsin-Varianten oder durch die
25 Verwendung einer zweifachmodifizierten Bakteriorhodopsin-Variante erhalten werden. Weiterhin ist auch die kombinierte Überprüfung von Niedrigsicherheits- und Hochsicherheitsmerkmalen möglich.
- 4/238
- 30 Bakteriorhodopsin ist ein Membranprotein halophiler Bakterien. Aus Mikroorganismen der Gattung Halobacterium kann das Protein Bakteriorhodopsin in großen Mengen gewonnen werden. Das Wildtyp-Bakte-

- 9 -

riorhodopsin ist dem Fachmann in seinen grundlegenden photochemischen und physikalischen Eigenschaften gut bekannt als photochromes Material, welches, durch Licht aktiviert, eine zyklische Folge von Intermediaten durchläuft. Zur Modellierung der photochromen Eigenschaften

5 wird hierbei ein stark vereinfachter Photozyklus benutzt, der nur noch zwei Zustände enthält, die als B- und M-Zustand bezeichnet werden. Durch Einstrahlung von Licht der Wellenlänge 568 nm wird der purpurfarbene B-Zustand in den gelbfarbenen M-Zustand umgewandelt, der seinerseits durch Absorption von Licht der Wellenlänge 412 nm in den B-

10 Zustand zurückverwandelt wird. Bakteriorhodopsin-Material kann also mit gelb-grünem Licht gebleicht werden, wobei die Purpurfärbung verschwindet und die gelbe Färbung erscheint. Man kann dann abwarten, bis die Purpurfärbung sich durch thermische Relaxation wieder einstellt, oder man benutzt blaues Licht, um das Bakteriorhodopsin-Material photochemisch wiederum in den B-Zustand zurückzuversetzen. Eine Übersicht der

15 genannten Eigenschaften des Bakteriorhodopsins findet sich in N. N. Vsevolodov, Biomolecular Electronics: An Introduction via Photosensitive Proteins, Birkhäuser, Boston, 1998 und in D. Oesterhelt, C. Bräuchle, N. Hampp, Bacteriorhodopsin: A Biological Material for Information Processing, Quarterly Review of Biophysics, 24 (1991) 425 - 478.

Dem Fachmann ist bekannt, dass es eine ganze Reihe von Varianten des Bakteriorhodopsins gibt, die zwar die gleiche Anfangsfärbung aufweisen wie der Wildtyp, sich jedoch in der Kinetik ihres Photozyklusses teilweise erheblich unterscheiden. Ein bevorzugtes Beispiel ist die Variante BR-
25 D96N. Deren Eigenschaften sind in verschiedenen Publikationen beschrieben, z.B. in A. Miller, D. Oesterhelt, Kinetic Optimization of Bacteriorhodopsin by Aspartic Acid 96 as an Internal Proton Donor, Biochim. Biophys. Acta 1020 (1990) 57 - 64.

30 Erfnungsgemäß bevorzugt wird ein Bakteriorhodopsin verwendet, welches vorteilhafterweise mit sichtbarem Licht gebleicht werden kann.

- 10 -

Als vorteilhaft hat sich ein Wellenlängenbereich von 500 bis 600 nm erwiesen. Die Rückführung des Bakteriorhodopsins in den Ausgangszustand kann dann durch thermische Relaxation oder durch Einstrahlung von Licht eines zweiten Wellenlängenbereichs erzielt werden. Für diesen zweiten Wellenlängenbereich werden vorteilhafterweise Wellenlängen im Bereich 400 bis 450 nm verwendet.

Die sichtbare Bleichung des Bakteriorhodopsins unter Bestrahlung ist umso leichter zu detektieren, je höher die Lebensdauer des M-Zustands ist. Typischerweise erreicht man eine Bleichung von etwa 90 % des Bakteriorhodopsin-Materials mit Lichtleistungen kleiner als 100 mW/cm² bei 532 nm.

Bisher sind in der Literatur keine Zubereitungen, wie z.B. Lacke, Tinten oder Druckfarben für die Applikation mittels Drucktechnik und/oder die Anwendung im Bereich Sicherheitstechnik beschrieben, die Bakteriorhodopsin als photochrome Komponente enthalten. Gegenüber den genannten konventionellen photochromen Materialien liefert Bakteriorhodopsin folgende Vorteile:

1. Zum Farbwechsel kann Licht sichtbarer Wellenlänge eingesetzt werden.
2. Beide Schaltzustände weisen eine detektierbare Eigenfärbung auf.
3. Durch Anwendung gentechnischer Methoden lassen sich Bakteriorhodopsin-Funktionsvarianten durch Aminosäureaustausch herstellen. Die so gewonnenen Bakteriorhodopsin-Varianten unterscheiden sich in ihrer Kinetik (BR-D96N) und/oder in ihrer Anfangsabsorption und ihrem Photozyklus (BR-D85N) vom Wildtyp-Bakteriorhodopsin.
4. Die Zahl der möglichen Schaltzyklen liegt höher als 10^5 .

- 11 -

In den Mikroorganismen der Gattung Halobacterium liegt Bakteriorhodopsin in der sogenannten Purpurmembran-Form vor. Herstellung und Isolierung des Bakteriorhodopsins in Purpurmembran-Form ist technisch wohlbekannt (vgl. z.B. EP 0 406 850 B1).

5

Bakteriorhodopsin wird im Wildtyp in Form eines zweidimensionalen Teils der Zellmembran vorgefunden, der ausschließlich aus Bakteriorhodopsin und Lipiden besteht. Dieser Teil wird Purpurmembran genannt. In dieser Form ist Bakteriorhodopsin thermodynamisch besonders stabil, für ein
10 Protein sogar außergewöhnlich stabil. Dies ist Voraussetzung für eine Vielzahl technischer Anwendungen und auch im Bereich der erfindungsgemäßen Zubereitungen, wo Bakteriorhodopsin als Pigment eingesetzt wird. Deshalb wird erfindungsgemäß BR oder/und eine BR-Variante besonders bevorzugt in der Purpurmembran-Form eingesetzt.

15

Als Bakteriorhodopsin kann der Wildtyp verwendet werden, erfindungsgemäß bevorzugt enthält die photochrome Tinte aber mindestens eine Bakteriorhodopsin-Variante als photochromen Anteil. Eine Bakteriorhodopsin-Variante unterscheidet sich vom Wildtyp durch mindestens eine
20 Veränderung. Bevorzugt wird die Bakteriorhodopsin-Variante ausgewählt aus Funktionsvarianten, Sequenzvarianten, Derivatisierungsvarianten, Chromophorvarianten, isotopen Varianten oder/und Spin-Label-Varianten.

25 Bakteriorhodopsin-Sequenzvarianten, die auch Bakteriorhodopsin-Funktionsvarianten sein können, können in Halobacterium salinarum exprimiert werden. Dabei wird das Bakteriorhodopsin in die Zellmembran eingebaut, die dann isoliert werden kann. In einigen Fällen ist das erhaltene Material nicht zweidimensional kristallin, aber das Bakteriorhodopsin membrangebunden.

30

Bei der Erzeugung von Bakteriorhodopsin-Varianten durch gezielten Austausch einzelner Aminosäuren können durch Austausch von Amino-

- 12 -

säuren in für die photochrome Funktion unbedeutenden Bereichen Sequenzvarianten hergestellt werden können. Ein Aminosäureaustausch kann durch ortsgereichtete Mutagenese des für das Bakteriorhodopsin kodierenden Gens durchgeführt werden.

5

Hierdurch ist aber nun die Erschließung eines Hochsicherheitsmerkmals gegeben, denn der gezielte Aminosäureaustausch im Bakteriorhodopsin-Molekül kann zu Identifizierungszwecken verwendet werden und wird dadurch zum Sicherheitsmerkmal. Bei Austausch von z. B. nur vier 10 Aminosäurepositionen mit den 20 biogenen Aminosäuren können $4^{20} \approx 10^{12}$ unterscheidbare Bakteriorhodopsin-Materialien hergestellt werden.

Dadurch ist es ohne großen technischen Aufwand möglich, eine enorme Vielzahl von Bakteriorhodopsin-Molekülen herzustellen, die photochrom 15 funktionell identische Bakteriorhodopsin-Materialien umfassen, sich aber voneinander in eindeutiger Weise, nämlich in ihrer Aminosäuresequenz, unterscheiden.

Das zusätzliche Hochsicherheitsmerkmal kann nicht ohne aufwendige 20 Analytik erkannt werden. Im Stand der Technik beschrieben sind verschiedene Verfahren, mit denen die Zusammensetzung von Bakteriorhodopsin-Materialien mit den genannten Modifikationen noch zuverlässig detektiert werden kann. Allen voran ist hier die Massenspektroskopie zu nennen (vgl. K. L. Schey, D. I. Papac, D. R. Knapp und R. K. Crouch, 25 Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry of Rhodopsin and Bakteriorhodopsin, Biophys., J. 63 (1992), 1240 - 1243, P. Hufnagel, U. Schweiger, C. Eckerskorn und D. Oesterhelt, Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Genetically and Chemically modified Bakteriorhodopsins, Anal. Biochem. 243 (1996) Nr. 1, 46 - 54, L. E. Ball, J. E. Jr. 30 Oatis, K. Dharmasiri, M. Busman, J. Wang, L. B. Cowden, A. Galijatovic, N. Chen, R. K. Crouch and D. R. Knapp, Mass Spectrometric Analysis of Integral Membrane Proteins: Application to Complete mapping of Bacte-

- 13 -

riorhodopsins and Rhodopsin, Protein Sci. 7 (1998) Nr. 3, 758 - 764).

Die bevorzugten Bakteriorhodopsin-Materialien kombinieren ein Niedrigsicherheitsmerkmal, nämlich die optisch leicht zu detektierende Photochromie, mit einem Hochsicherheitsmerkmal, z. B. eine Sequenzvariation
5 in der Aminosäuresequenz des Bakteriorhodopsins selbst.

Zu den von der Erfindung umfassten Niedrigsicherheitsmerkmalen zählen

1. verschiedene Anfangsfärbungen der Bakteriorhodopsin-Materialien,
2. verschiedene Photozyklen,
- 10 3. verändertes kinetisches Verhalten.

Das erfindungsgemäße Niedrigsicherheitsmerkmal kann bevorzugt unter Einsatz von Bakteriorhodopsin-Funktionsvarianten erreicht werden, kann aber auch durch andere Bakteriorhodopsin-Varianten, wie etwa Bakte-
15 riorhodopsin-Derivatisierungsvarianten und/oder Bakteriorhodopsin-Chromophor-Varianten erreicht werden.

Unter Bakteriorhodopsin-Funktionsvarianten sollen insbesondere Varianten verstanden werden, die sich in ihrem Absorptionsspektrum und/oder
20 ihrem Photozyklus vom Bakteriorhodopsin-Wildtyp unterscheiden.

Eine bekannte Funktionsvariante ist z.B. die Variante D96N, bei der die Asparaginsäure an Position 96 durch Asparagin ausgetauscht ist. Diese Bakteriorhodopsin-Funktionsvariante und einige weitere sind beschrieben
25 bei: "H. Otto, T. Marti, M. Holz, T. Mogi, M. Lindau, H. G. Khorana und M. P. Heyn, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86 (1989), S. 9228-9232" und "T. E. Thorgeirsson, S. J. Milder, L. J. W. Miercke, M. C. Betlach, R. F. Shand, R. M. Stroud und D. S. Kliger, Biochemistry 30 (1991), S. 9133-9142".

30

Unter Bakteriorhodopsin-Derivatisierungsvarianten sollen insbesondere Bakteriorhodopsin-Varianten verstanden werden, die sich vom Wildtyp

- 14 -

durch die kovalente Ankopplung von Molekülen unterscheiden. Solche
Moleküle können beispielsweise die Aufgabe haben, das Molekulargewicht
wicht von Bakteriorhodopsin zu vergrößern, um in der Massenspektroskopie
ein derartiges Molekül identifizieren zu können oder ein farbiges
5 Moleköl sein, um so das Absorptionsspektrum des Bakteriorhodopsins zu
verändern, oder ein fluoreszierendes Moleköl sein, um so eine an das
Bakteriorhodopsin-gekoppelte Fluoreszenz beobachten zu können. Ebenso
kann das Bakteriorhodopsin-Material auch an ein Polymer kovalent
10 gekoppelt sein. Die Kopplungsreaktion kann z.B. nach Chignell & Chignell,
Biophys. Biochem. Res. Commun. 62 (1975), S. 136-143 und nach
Renthal et al., Biochemistry 22 (1983), S. 5-12 durchgeführt werden.

Der anfängliche Farbeindruck des Bakteriorhodopsin-Materials bzw. der
photochromen Tinte sowie der Farbeindruck des gebleichten Zustandes
15 können durch kovalente Ankopplung geeigneter Farbstoffe an die Bakte-
riorhodopsin-Moleküle oder/und einfaches Zumischen von passiven
Farbstoffen oder Pigmenten stark beeinflusst werden. Der visuelle Ein-
druck der entstehenden Farbmischungen lässt sich im CIE-Diagramm
leicht anschaulich visualisieren. Der Fachmann kann die Farbwirkung mit
20 bekannten Methoden solcher Art bestimmen.

Es können Linkermoleküle an das Bakteriorhodopsin gekoppelt werden,
die es erlauben, an diese wiederum weitere Verbindungen anzukoppeln.
Moleküle, die zu den erfindungsgemäßen Aufgaben angekoppelt werden
25 können, dienen dazu, das Molekulargewicht von Bakteriorhodopsin zu
vergrößern, um in der Massenspektroskopie ein derartiges Moleköl
identifizieren zu können.

Unter Bakteriorhodopsin-Chromophor-Varianten sollen insbesondere
30 Bakteriorhodopsin-Varianten verstanden werden, die sich vom Wildtyp
durch die Entfernung bzw. den Austausch der chromophoren Retinyldien-
Gruppe durch ein anderes Moleköl, insbesondere durch sogenannte

- 15 -

- Retinal-analoge Moleküle, unterscheidet. Das Retinal-analoge Molekül kann kovalent über Lysin-216 an Bakteriorhodopsin gebunden sein.
- Somit sind weitere Möglichkeiten zur Herstellung von Bakteriorhodopsin-
- 5 Varianten durch Ersetzen der chromophoren Retinyliden-Gruppe möglich. Hierbei wird eine Modifikation der photophysikalischen Eigenschaften erreicht, wobei bevorzugt Dihydroretinal oder 4-Ketoretinal zum Einsatz kommen können.
- 10 Unter Bakteriorhodopsin-Isotopenvarianten sollen insbesondere solche Bakteriorhodopsin-Varianten verstanden werden, bei denen einige oder alle Aminosäuren teilweise oder vollständig mit ^{13}C oder ^{15}N markiert sind. Dies kann dadurch erreicht werden, dass einige markierte Aminosäuren dem Wachstumsmedium zugesetzt werden oder Pepton eingesetzt
- 15 wird, das als Ganzes markiert wird. Mittels hochauflösender NMR können die so markierten Verbindungen identifiziert werden.
- Unter Bakteriorhodopsin-Spin-Label-Varianten sollen insbesondere solche Bakteriorhodopsin-Varianten verstanden werden, die ein Spin-Label
- 20 kovalent an das Bakteriorhodopsin-Molekül gebunden enthalten. Dies kann z. B. dadurch erreicht werden, dass ein Derivat von TEMPO (2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-N-oxyl) oder DOXYL (4,4-Dimethyloxazolidin-N-oxyl) oder PROXYL (2,2,5,5-Tetramethylpyrrolidin-N-oxyl) kovalent an das Bakteriorhodopsin-Material gekoppelt wird. Mittels ESR kann die
- 25 Anwesenheit und Art des Spin-Labels geprüft werden.
- Unter Bakteriorhodopsin-Sequenzvarianten sollen insbesondere solche Bakteriorhodopsin-Varianten verstanden werden, die sich vom Wildtyp durch den Verlust oder den Austausch oder die Hinzufügung einer oder
- 30 mehrerer Aminosäuren unterscheiden, die aber nicht zu einer wesentlichen Beeinflussung des Photozyklus führen. Sequenzvarianten von

- 16 -

Bakteriorhodopsin sind z. B. D36C oder Varianten, bei denen am N-Terminus oder C-Terminus Aminosäuren angehängt werden.

- Die Kombination der Modifikationen der oben genannten Varianten führt
5 zu neuen, bevorzugten Varianten, wodurch eine enorme Vielzahl an verschiedenen Bakteriorhodopsin-Zubereitungen möglich wird. Dadurch wird ein Hochsicherheitsmerkmal erhalten, da der Aufwand für die Analyse sehr hoch wird und gleichzeitig jede einzelne Charge aufgrund der großen Vielfalt eindeutig identifiziert werden kann.
- 10 Die Bakteriorhodopsin-Variante wird bevorzugt ausgewählt aus D36X, D96X und D85X, worin X für eine der natürlich vorkommenden Aminosäuren steht. Besonders bevorzugt wird die BR-Variante ausgewählt aus D36C, D96N und D85N.
- 15 Besonders bevorzugt werden Mutanten verwendet, die eine gesteigerte Lichtempfindlichkeit aufweisen und insbesondere Materialien, wie sie auch für die Holographie eingesetzt werden.
- 20 Die Bakteriorhodopsin-Zubereitung kann weiterhin neben Bakteriorhodopsin ein herkömmliches, nicht photochromes Pigment, oder/und ein Fluorochrom oder/und ein an Bakteriorhodopsin kovalent gebundenes Pigment oder/und ein weiteres photochromes Pigment enthalten. Durch die Mischung mit Bakteriorhodopsin kann das nichtphotochrome Pigment
25 oder Fluorochrom innerhalb der Sicherheitsmarkierung verborgen sein. Bei einer solchen Ausführungsform kann es weiterhin zweckmäßig sein, zusätzlich zum sichtbaren Licht UV-Licht zu verwenden.
- Des Weiteren lassen sich fluoreszierende oder phosphoreszierende Moleküle an die Bakteriorhodopsin-Moleküle koppeln, wodurch deren Emission
30 ein zusätzliches Merkmal darstellt. Durch geeignete Wahl der Lage der Emission kann eine Unterdrückung der Fluoreszenz erzielt werden, wenn

- 17 -

sich das Bakteriorhodopsin-Material im ungebleichten Zustand befindet. Dies wird erreicht, wenn die Lage der anfänglichen Bakteriorhodopsin-Absorption und der Emission des fluoreszierenden oder phosphoreszierenden Materials stark überlappt. In diesem Fall absorbiert das Bakteriorhodopsin-Material die emittierten Photonen und mit bloßem Auge ist dann keine Fluoreszenz wahrnehmbar. Die Fluoreszenz wird erst dann sichtbar, wenn das Bakteriorhodopsin-Material photochemisch gebleicht wird.

Die Prüfung der Zusammensetzung des applizierten Bakteriorhodopsin-Materials kann z.B. durchgeführt werden, indem mittels mikroanalytischer Sequenzierung die Aminosäuresequenz des Bakteriorhodopsin-Materials ganz oder teilweise bestimmt wird oder indem mittels immunologischer Verfahren die Reaktion mit einem spezifischen Antikörper gemessen wird.

Bakteriorhodopsin-Materialien, die Hochsicherheitsmerkmale umfassen, enthalten vorzugsweise Bakteriorhodopsin-Varianten

1. mit gezielt veränderten Aminosäuresequenzen, wobei die Sequenzänderung nicht die photophysikalischen Eigenschaften beeinflusst,
2. mit kovalent angekoppelten Molekülen und
- 20 3. mit Aminosäuren, die mit ^{13}C und/oder ^{15}N und/oder anderen Isotopen markiert sind.

Besonders bevorzugt sind Kombinationen aus zwei oder mehr der obigen Bakteriorhodopsin-Variantentypen.

25 Besonders bevorzugt wird in dem erfindungsgemäßen Verfahren mindestens eine Bakteriorhodopsin-Variante verwendet mit den Merkmalen:

- a) der zur Ausbildung der Purpurmembran-Form des Proteins notwendige Bereich ist gegenüber dem Bakteriorhodopsin-Wildtyp unverändert und
- 30 b) in Schleifen oder/und dem C-Terminus oder/und dem N-Terminus der Polypeptidkette ist mindestens ein Amino-

| 8/58-59

- 18 -

säure-Austausch gegenüber dem Bakteriorhodopsin-Wildtyp vorhanden, umfassend Deletionen, Additionen, Insertionen oder/und Substitutionen, wobei diese Aminosäure-Austausche nicht zur einer Änderung der durch den photochromen Bereich bestimmten photochromen Eigenschaften des Bakteriorhodopsins führen.

Solche Bakteriorhodopsine sind in dem zur Ausbildung der Purpurmembran-Form des Proteins notwendigen Bereich gegenüber dem Bakteriorhodopsin-Wildtyp unverändert. Ausreichend für die Zwecke dieser Erfindung ist es auch, wenn das Bakteriorhodopsin trotz geringfügiger Änderungen in diesem Bereich weiterhin zur Ausbildung einer Purpurmembran fähig ist.

Die erfindungsgemäßen Änderungen in der Aminosäuresequenz umfassen Aminosäureaustausche, wie z. B. Deletion, Insertion, Substitution und/oder Addition an beliebigen Positionen innerhalb der gesamten Polypeptidkette. Besonders bevorzugt sind Additionen von Aminosäuren an den N- oder/und C-Termini oder/und den insbesondere außerhalb der Membran liegenden Schleifen der Polypeptidkette. Die erfindungsgemäß durchgeführten Änderungen zur Codierung des Hochsicherheitsmerkmals werden somit bevorzugt nicht in dem Bereich des Bakteriorhodopsins durchgeführt, der die photochromen Eigenschaften beeinflusst. Der Aminosäureaustausch in den Schleifen und/oder dem C-Terminus oder/und dem N-Terminus der Polypeptidkette führt bei geeigneter Durchführung nicht zu einer Änderung der photochromen Eigenschaften des Ausgangs-Bakteriorhodopsins. An dieser Stelle soll festgehalten werden, dass als Ausgangs-Bakteriorhodopsin sowohl ein Bakteriorhodopsin des Wildtyps als auch ein bereits modifiziertes Bakteriorhodopsin, insbesondere BR-D96N, verwendet werden kann.

- 19 -

- Die zur Analyse einsetzbaren Aminosäureaustausche bewirken bevorzugt Massenänderungen des Bakteriorhodopsin-Moleküls von mindestens einem Dalton, noch bevorzugter mindestens 10 Dalton, und am meisten bevorzugt mehr als 100 Dalton. Zur Analyse werden Geräte und Ionisationsverfahren des Standes der Technik, wie z. B. FTMS (Fourier Transform Massenspektrometer) und/oder TOF (Flugzeitmassenspektrometer) und/oder MALDI (Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation) und/oder ESI (Elektrosprayionisation) eingesetzt.
- 5 Die Addition/Insertion von Aminosäuren kann insbesondere bis zu 1000 zusätzliche Aminosäuren umfassen, bevorzugt bis zu 100 Aminosäuren, besonders bevorzugt bis zu 50 Aminosäuren, und mindestens eine, am meisten bevorzugt 3 bis 20 Aminosäuren. Eine Addition von mindestens 6 Histidin-Resten am C-Terminus kann genutzt werden, um die Anwesenheit der Bakteriorhodopsin-Variante über die Bindung von Metallen mittels XRF oder TXRF zu detektieren.
- 10 15

Die Deletion oder Substitution betrifft insbesondere 1 bis 10 und besonders bevorzugt 1 bis 4 Aminosäuren.

20

Als Substitutionsvariante bevorzugt eingesetzt wird die Bakteriorhodopsin-Variante, deren Asparaginsäurerest in Position 36 durch einen Cysteinrest ersetzt ist (BR-Variante D36C).

25

Die Molekulargewichte der Aminosäuresequenzvarianten der Bakteriorhodopsin-Moleküle lassen sich durch Massenspektroskopie mit ESI oder MALDI-TOF bestimmen. Nach Rückrechnung der Massenspektren erhält man die Molmassen der untersuchten Substanzen mit einer Auflösung von bis zu einer Massenzahl. Bei der Änderung der Aminosäuresequenz, z.B. auch durch Deletion oder Insertion, kommt es zu vergleichsweise großen Massenzahländerungen, die analytisch gut detektierbar sind. Selbst wenn nur einige wenige Aminosäuren durch andere Amino-

30

- 20 -

säuren ersetzt werden, sind die resultierenden Massenänderungen analytisch ausreichend.

- Bevorzugt wird eine Bakteriorhodopsin-Variante verwendet, bei der am C-
5 Terminus mindestens eine Aminosäure addiert ist. Weiterhin ist es bevorzugt, Bakteriorhodopsin-Varianten zu verwenden, die mindestens ein Cystein enthalten. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird mindestens eine Bakteriorhodopsin-Variante eingesetzt, welche
10 einen vom Wildtyp verschiedenen Photozyklus oder/und eine vom Wildtyp verschiedene Anfangsfarbe besitzt.

Am meisten bevorzugt werden Bakteriorhodopsin-Varianten eingesetzt, die eine verminderte Licht-Dunkel-Adaption aufweisen. Bakteriorhodopsin, das seine maximale Absorption bei 570 nm hat (B-Zustand), relaxiert im Dunkeln langsam mit einer Halbwertszeit von etwa 10 bis 20 Minuten teilweise in einen Zustand mit maximaler Absorption bei 548 nm, den sog. D-Zustand. Beim Bakteriorhodopsin-Wildtyp stellt sich im Dunkeln ein Gleichgewicht von etwa 50 : 50 B-Zustand zu D-Zustand ein. Der B-Zustand weist all-trans, der D-Zustand 13-cis-Konfiguration des Retinals auf. Unter Belichtung wird Bakteriorhodopsin zunächst zu 100% in den B-Zustand überführt, von wo aus der Photozyklus beginnt, in dessen Verlauf die gewünschte starke Farbänderung auftritt (Absorptionsverschiebung nach 412 nm).

- 25 Ist nun eine erfindungsgemäße Bakteriorhodopsin enthaltende photochrome Tinte bzw. der damit markierte Gegenstand über längere Zeit im Dunkeln aufbewahrt worden, so ist das Bakteriorhodopsin in seinen sog. Dunkel-adaptierten Zustand übergegangen. Wird nun die zu prüfende Fläche erstmals mit Licht bestrahlt, um das Bakteriorhodopsin zu bleichen, so scheint sie eine verminderte Lichtempfindlichkeit bzw. eine
30 reduzierte Ausbleichgeschwindigkeit aufzuweisen. Dies wird dadurch verursacht, dass ein Teil des eingestrahlten Lichts verbraucht wird, um

- 21 -

Bakteriorhodopsin aus dem D-Zustand in den B-Zustand zu überführen.
Wird die einmal herbeigeführte Bleichung wieder umgekehrt, z.B. mit
blauem Licht, d.h. wird der lila-farbene Anfangszustand wiederherge-
stellt, so zeigt bei unmittelbar darauf folgenden weiteren Belichtungen
5 das Material die gewünschte hohe Lichtempfindlichkeit. Wünschenswert
ist aber, dass die photochromen Eigenschaften auch nach Lagerung im
Dunkeln bereits im ersten Zyklus auftreten. Deshalb sind Bakteriorhodop-
sin-Varianten mit verminderter oder völlig abwesender Licht-Dunkel-
Adaption bevorzugte Materialien für die erfindungsgemäßen Verwendun-
gen.
10

Bakteriorhodopsin-Varianten, die eine verminderte oder abwesende Licht-
Dunkel-Adaption aufweisen, können durch die Verwendung von Retinal-
Analoga bzw. durch Bakteriorhodopsin-Varianten mit veränderter Amino-
säuresequenz erhalten werden. Besonders geeignete Beispiele sind
15 Bakteriorhodopsine mit einem chemisch modifizierten Chromophor, wie
etwa 13-Demethyl-11,14-epoxy-Bakteriorhodopsin (M. Muradin-Szwey-
kowska et al., Rec.: J.R. Neth. Chem. Soc. 102 (1983), 42-46. Weitere
bevorzugte Varianten sind Bakteriorhodopsine, die ein 13-substituiertes
20 Retinal enthalten, insbesondere ein Retinal, welches an Position 13 ein H-
Atom, eine Ethyl- oder eine Propylgruppe trägt (W. Gaertner et al.,
Biochemistry 27 (1988), 3497-3502. Arg-82-, Asp-85- und Asp-212-
Mutanten mit verminderter Lichtadaption, die hierin ebenfalls bevorzugt
verwendet werden, sind beispielsweise bei M.P. Krebs et al., Proc. Natl.
25 Acad. Sci. USA 90 (1993), 1987-1991, beschrieben. Weitere bevorzugte
Mutanten sind Y185F (P. Rath et al., Biochemistry 32 (1993), 2272-
2281) sowie die bei S.P. Balashow et al., Biochemistry 32 (1993),
10331, 10343, sowie bei K. Ihara et al., Biophys. J. 67 (1994), 1187,
30 1191, beschriebenen Mutanten, insbesondere Arg-82-Ala sowie Met-
145. Allgemein sind Varianten bevorzugt, die auch im Dunkeln im B-
Zustand verbleiben und nicht in den D-Zustand übergehen.

- 22 -

An Bakteriorhodopsin-Moleküle kovalent angekoppelte Moleküle bieten eine weitere Option von Hochsicherheitsmerkmalen. Durch die Kopplung von Molekülen wird eine weitere Analysedimension ermöglicht, beispielsweise über den Nachweis bestimmter Eigenschaften der angekoppelten Moleküle oder über deren Masse. Angekoppelte Moleküle können z.B. Biotin und/oder Avidin oder/und Digoxygenin sein. Außerdem kann man Moleküle ankoppeln, die massenspektroskopisch separat nachgewiesen werden können. Die Ankoppelung von Spin-Label-Molekülen, wie z.B. TEMPO, DOXYL oder PROXYL, kann in einer ESR-Analyse, die auch mit Einschränkungen unter Einsatz eines Feststoffs durchgeführt werden kann, ermittelt werden. Mit den stabilen Isotopen ^{13}C und ^{15}N markierte Aminosäuren können durch NMR-Analyse detektiert werden. (M. Engelhard, B. Hess, G. Metz, W. Kreutz, F. Siebert, J. Soppa und D. Oesterhelt, High resolution carbon-13-solid state NMR of bacteriorhodopsin: assignment of specific aspartic acids and structural implications of single site mutations, Eur. Biophys. J. 18 (1990), 17-24).

Hochsicherheitsmerkmale zur Authentizitätsprüfung können überraschenderweise auch durch Verwendung von polymeren Molekülen, deren Monomerensequenz bekannt ist und die gegebenenfalls an Bakteriorhodopsinmoleküle angekoppelt sind, erhalten werden. Als polymere Moleküle können dabei z.B. Oligopeptide, Polypeptide, Proteine, Nukleinsäuren, peptidische Nukleinsäuren (PNAs) oder auch synthetische, nicht in der Natur vorkommende Polymere eingesetzt werden. Die Polypeptide und Proteine können dabei Nicht-Proteinanteile, die Nukleinsäuren Nicht-Nukleinsäure-Anteile enthalten. Die Nicht-Proteinanteile und die Nicht-Nukleinsäure-Anteile können z. B. Glykosidanteile, Biotin oder/und Digoxygenin oder/und Avidin umfassen.

Es ist also auch möglich, zusätzlich zum BR der Tinte ein oder mehrere weitere Polymere zuzumischen, welche als informationstragende Bestandteile weitere Hochsicherheitsmerkmale liefern oder z.B. lediglich zur

- 23 -

Einstellung der Viskosität oder anderer mechanischer Eigenschaften der Markierung dienen.

- Die an Bakteriorhodopsin als Hochsicherheitsmerkmal angekoppelten polymeren Moleküle, wie z.B. DNA- oder/und RNA- oder/und PNA-Moleküle oder/und Hybride aus den genannten Molekülsorten können z.B. durch geeignete Amplifikationsreaktionen, wie der PCR-Reaktion mittels spezifischer Primer, detektiert werden. Die Detektion kann hierbei die gelelektrophoretische Größenanalyse aber auch die direkte Nukleinsäurebasensequenzbestimmung umfassen. Polypeptide können in ähnlicher Weise durch mikroanalytische Sequenzbestimmung analysiert und detektiert werden. Aufgrund der Möglichkeiten, die die organische Synthese von Nukleinsäuren und Polypeptiden bietet, können auch nicht in der Natur vorkommende Sequenzen zum Einsatz kommen.
- Die Kombination von Niedrigsicherheitsmerkmalen und Hochsicherheitsmerkmalen bietet interessante Vorteile. Eine solche Kombination kann beispielsweise dadurch erhalten werden, dass die photochrome Eigenschaft von Bakteriorhodopsin als Niedrigsicherheitsmerkmal mit einem der oben genannten Hochsicherheitsmerkmalen kombiniert wird. Besonders vorteilhaft ist es, hierzu Bakteriorhodopsin gemeinsam mit einem polymeren Molekül zu verwenden. Das Bakteriorhodopsin bzw. eine Bakteriorhodopsin-Variante kann aber auch selbst als analysierbares polymeres Molekül verwendet werden. Trotz enormer Variabilität sind die Sicherheitsmerkmale untrennbar miteinander verbunden. Daneben ist es möglich, zusätzlich zum Bakteriorhodopsin als photochromem Material davon verschiedene Polymere an BR gekoppelt oder/und in freier Form zu verwenden.
- Das erfindungsgemäße Verfahren zur Sicherung der Authentizität von Gegenständen umfasst die Applikation einer photochromen Zubereitung in Form einer Tinte oder Druckfarbe auf dem jeweiligen Gegenstand. Die

- 24 -

erfindungsgemäße photochrome Zubereitung enthält dabei neben Bakteriorhodopsin der Wildtypform oder/und mindestens einer Bakteriorhodopsin-Variante als photochromen Anteil gegebenenfalls geeignete Hilfsstoffe und/oder geeignete Matrixmaterialien.

5

Die Hilfsstoffe werden eingesetzt für den Applikationsprozess: Zur Vermeidung der Schaumbildung und zur Verbesserung der Benutzungseigenschaften oder/und für die Stabilität: Zur Mikroverkapselung der Zubereitungsmaterialien und zur Abschirmung von UV-Strahlen oder/und 10 für die Verbesserung des visuellen optischen Eindrucks: Zur Beeinflussung des Absorptionsspektrums, z.B. im ungebleichten und gebleichten Zustand von Bakteriorhodopsin-Material. Beispiele für solche Hilfsstoffe sind passive Farbstoffe oder Pigmente, die der Tinte einfach zugemischt werden, um eine gewünschte Anfangs- bzw. Endfärbung zu erzielen. Auf 15 diese Weise können auch Mischfarben gebildet oder/und das Spektrum verschoben werden.

Geeignete Matrixmaterialien werden eingesetzt zur Fixierung des Zubereitungsmaterials durch physikalischen Einschluss oder/und kovalente Koppelung an das Matrixmaterial oder/und nachträgliche Quervernetzung des Zubereitungsmaterials bzw. des Matrixmaterials mittels chemischer oder photochemischer Methoden. Die Quervernetzung kann dabei eine Behandlung mit Glutaraldehyd, Transglutaminase, (radikalische) Polymerisation oder/und eine photochemische Quervernetzung umfassen.

25

Die Applikation der erfindungsgemäßen photochromen Zubereitung kann mittels bekannter drucktechnischer Verfahren erfolgen, wie z.B. Offset-, Sieb-, Inkjet-, oder Tampondruck durch mechanischen Auftrag mittels Pinsel, durch Sprühen, Tauchen oder Elektrophorese. Das erfindungsgemäße Bakteriorhodopsin-Material kann durch anschließende Trocknung verfestigt und das synthetische oder biologische Matrixmaterial durch eine Nachbehandlung unlöslich gemacht werden. Appliziert werden kann

- 25 -

die Zubereitung selbst oder ein Hilfssubstrat auf dem die Zubereitung aufgebracht ist. Die Bakteriorhodopsin-Zubereitung kann in mikroverkapselter Form vorliegen. Mikroverkapselte Farbzubereitungen sind für Druckverfahren besonders geeignet.

5

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird zur Markierung eines Gegenstandes unter Verwendung der photochromen Tinte die photochrome Tinte auf den Gegenstand aufgebracht, anschließend durch Trocknung verfestigt und mittels eines 10 Matrixmaterials fixiert, wobei durch Belichtung ein Farbwechsel der photochromen Zubereitung herbeiführbar ist. Die zum Farbwechsel benötigte Mindestlichtenergie kann bevorzugt über dem pH-Wert der photochromen Zubereitung eingestellt werden.

- 15 Weiterhin ist es bevorzugt auf einen zu markierenden Gegenstand zwei Flächen A und B zu applizieren, welche insbesondere aneinandergrenzen, wobei die erste Fläche A mit der eine Bakteriorhodopsin-Variante enthaltenden Tinte markiert wird und das zweite Feld B mit einem nicht photochromen Farbstoff versehen wird, dessen spektrale Remission sich im unbelichteten Zustand nicht von der des ersten Feldes unterscheidet, aber nach der Belichtung eine gegenüber dem ersten Feld unterschiedliche 20 Remission zeigt. Weiterhin ist es auch möglich, auf den zu markierenden Gegenstand zwei insbesondere aneinandergrenzende Flächen A und B zu applizieren, wobei das erste Feld mit einer ersten Bakteriorhodopsin enthaltenden photochromen Zubereitung markiert wird, und das zweite Feld mit einer zweiten photochromen Zubereitung versehen wird, deren Lichtempfindlichkeit sich von der der ersten unterscheidet, so dass sich das zweite Feld im unbelichteten Zustand in seiner spektralen 25 Remission nicht von dem ersten Feld unterscheidet, aber nach der Belichtung eine gegenüber dem ersten Feld unterschiedliche Remission zeigt. Die zweite photochrome Zubereitung enthält bevorzugt Bakteriorhodopsin-Wildtyp oder/und eine Bakteriorhodopsin-Variante, die von 30

- 26 -

der in der ersten Zubereitung verwendeten BR-Variante verschieden ist und dient insbesondere als Referenzfarbe.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine photochrome Tinte,
5 welche mindestens eine, bevorzugt mindestens zwei Bakteriorhodopsin-Varianten enthält. Die bevorzugten Bakteriorhodopsin-Varianten sind wie oben beschrieben, wobei eine solche photochrome Tinte insbesondere zur Markierung von Gegenständen zur Sicherung der Authentizität geeignet ist.

10

Die erfindungsgemäße Tinte kann mit dem Fachmann bekannten herkömmlichen Farbstoffen, wie etwa Fluorochrom, Pigmenten oder/und weiteren photochromen Pigmenten, in Kombination verwendet werden. Die Bakteriorhodopsin-Materialien enthaltende Tinte nach der Erfindung
15 kann wie herkömmliche Tinte verwendet werden und ist außer zur Sicherung der Authentizität von Gegenständen z.B. auch zur Dekoration und für sonstige Spezialeffekte einsetzbar.

Unter Tinte wird hier auch jede gefärbte Schreibflüssigkeit/Druckflüssigkeit und ggf. pulverisiertes Applikationsmedium verstanden. Unter den
20 Begriff Tinte fallen auch Druckfarben und andere Farbzusammensetzungen, die zum Bedrucken von Gegenständen eingesetzt werden können oder die allgemein Verwendung bei der Erzeugung von Drucken finden. Bei Verwendung der Bakteriorhodopsin-Materialien als Tinte können als
25 Lösungsmittel Wasser oder andere Lösungsmittel, wie z. B. solche auf Alkoholbasis, verwendet werden. Bevorzugt umfasst die Tinte mindestens zwei BR-Varianten. Durch die Verwendung von mindestens zwei Bakteriorhodopsin-Varianten bzw. einer Bakteriorhodopsin-Variante, welche mindestens zwei Modifikationen aufweist, ergeben sich für eine
30 Analyse vorteilhafte Effekte, dadurch dass die Analyse zweidimensional durchführbar ist. Neben der bevorzugten Purpurmembranform des Bakte-

- 27 -

riorhodopsins kann die erfindungsgemäße Tinte zusätzlich Bakteriorhodopsin in solubilisierter Form enthalten.

- Bakteriorhodopsin in solubilisierter Form lässt sich gewinnen, indem das
- 5 Bakteriorhodopsin-Gen in einem Wirt wie z.B. E. coli exprimiert wird und mit zugesetztem Retinalaldehyd rekonstituiert wird. Eine weitere Möglichkeit ist, dass Bakteriorhodopsin aus Purpurmembran durch Entfernen der Lipide gewonnen wird. Dazu wird beispielsweise eine Purpurmembran-Suspension ($OD_{570} < 5$) in Wasser oder Puffer mit 1% Triton-X 100
- 10 versetzt und 1 h mit einer Mikrosonde eines Sonifiers kontinuierlich beschallt. Der nach dem Abzentrifugieren erhaltene Überstand enthält Bakteriorhodopsin in solubilisierter Form.

Die BR-enthaltende photochrome Zubereitung kann auf jeden beliebigen

15 Gegenstand appliziert werden. Gegenstände von besonderem Interesse sind z.B. Dokumente, Wertpapiere, Banknoten, Kunstwerke, Ausweise, Kleidungsstücke, Kraftfahrzeuge, Prüfzeichen, Qualitätssiegel, etc.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist somit ein Gegenstand mit

20 einer Markierung, welche mindestens eine Bakteriorhodopsin-Variante enthält. Diese Markierung wird vorzugsweise mit dem erfindungsgemäßem Verfahren hergestellt. Die Markierung enthält vorzugsweise eine photochrome Tinte wie oben beschrieben.

25 Wie oben bereits ausgeführt, hat Bakteriorhodopsin-Wildtyp eine geringe Lichtempfindlichkeit, so dass es mit normal intensiven Lichtquellen, zum Beispiel Sonnenlicht, praktisch nicht möglich ist, eine mit dem bloßen Auge gut detektierbare Bleichung herbeizuführen. Diese geringe Lichtempfindlichkeit resultiert aus einer geringen Lebensdauer des M-Zustandes.

- 28 -

Allerdings kann die Lebensdauer des M-Zustands von Bakteriorhodopsin-Wildtyp durch geeignete Maßnahmen verlängert werden. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist deshalb ein Verfahren zur Sicherung der Authentizität eines Gegenstandes durch Applizieren einer photochromen Tinte auf den Gegenstand, wobei man eine photochrome Tinte verwendet, die Bakteriorhodopsin-Wildtyp als photochromen Anteil enthält, welcher bei Bestrahlung mit Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich eine visuell detektierbare, als Niedrigsicherheitsmerkmal bei einer Authentizitätsprüfung nutzbare, reversible Zustandsänderung erfährt und die weiterhin einen Hilfsstoff enthält, welcher Wasser bindet oder/und die Protonenverfügbarkeit reduziert. Durch Hilfsstoffe, welche die niedrige Lichtempfindlichkeit des Bakteriorhodopsin-Wildtyps erhöhen, kann auch Bakteriorhodopsin-Wildtyp in Verfahren zur Sicherung der Authentizität eingesetzt werden. Solche Hilfsstoffe, die als Zusatz zur Tinte verwendet werden, dienen dazu, die Lebensdauer des M-Zustandes von Bakteriorhodopsin-Wildtyp zu steigern. Die Lebensdauer des M-Zustandes von Bakteriorhodopsin-Wildtyp steigt bei nahezu vollständiger Entfernung von Wasser an. Die Hilfsstoffe haben somit im Wesentlichen den Zweck, Wasser zu binden bzw. die Protonenverfügbarkeit zu reduzieren. Geeignete Hilfsstoffe sind beispielsweise Verbindungen, die primäre oder sekundäre Aminogruppen enthalten. Besonders bevorzugt werden als Hilfsstoffe Arginin oder Guanidinium x HCl eingesetzt. Diese Hilfsstoffe können auch bei Bakteriorhodopsin-Varianten zur Erhöhung der Lichtempfindlichkeit verwendet werden.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Sicherung der Authentizität eines Gegenstandes enthält die verwendete photochrome Tinte somit bevorzugt eine BR-Variante bzw. BR-Mutante, wobei die Mutation zur Nutzung als Information für ein Hochsicherheitsmerkmal und/oder zur Steigerung der Lichtempfindlichkeit dient. Besonders bevorzugt werden Varianten verwendet, die mindestens zwei Modifikationen enthalten, nämlich eine Modifikation zur Steigerung der Lichtempfindlichkeit des

- 29 -

Bakteriorhodopsins und eine weitere, welche mit bekannten Verfahren als Hochsicherheitsmerkmal detektiert werden kann.

Die Verwendung des Wildtyp-Bakteriorhodopsins alleine ist aufgrund der
5 geringen Lichtempfindlichkeit (Wildtyp-Bakteriorhodopsin ändert bei
üblichen Beleuchtungsstärken seine Farbe nicht in erkennbarem Maße)
nur bedingt geeignet und aufgrund der allgemeinen Verfügbarkeit von
Wildtyp-Baktriorhodopsin auch für eine Authentizitätssicherung nur von
relativ geringem Interesse. Durch die Verwendung einer Kombination von
10 Bakteriorhodopsin-Wildtyp und einem der oben beschriebenen Zusätze
zur Steigerung der Lichtempfindlichkeit können jedoch interessante
Anwendungen erschlossen werden. In einer weiteren bevorzugten
Ausführungsform werden die oben beschriebenen Zusätze zur Steigerung
der Lichtempfindlichkeit bzw. andere Zusätze, etwa zur Einstellung der
15 Anfangsfärbung, Markierungen etc. zusammen mit einer oder mehreren
Bakteriorhodopsin-Varianten oder Bakteriorhodopsin-Mutanten verwen-
det.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele in Verbindung mit den
20 Abbildungen 1 und 2 näher erläutert.

Abbildung 1 zeigt den Ablauf eines Verfahrens zur Authentizitätsprüfung.

Abbildung 2 zeigt einen Kopiervorgang unter Verwendung eines Sicher-
25 heitsmerkmals.

Beispiel 1: Niedrigsicherheitsmerkmal-Prüfung

Für den Anwender leicht zu prüfen sind die photochromen Eigenschaften
30 von Bakteriorhodopsin bzw. BR-Varianten (Abbildung 1). Ein auf einem
Dokument 1, wie beispielsweise einer Banknote, einem Wertpapier,
einem Kunstwerk oder einem anderen wertvollen Gegenstand appliziertes

- 30 -

- Merkmal 2, hergestellt aus einer Zubereitung, die die Variante D96N des Bakteriorhodopsins enthält, lässt sich z.B. dadurch prüfen, dass es bei Bestrahlen mit Licht 3 einer Leuchtdiode mit einem Emissionsmaximum im grünen oder gelben Bereich seine Farbe von purpur nach gelb ändert.
- 5 Dies ist besonders leicht zu erkennen in 4, wenn nicht die ganze Fläche bestrahlt wird. Ohne weiteres Zutun, kehrt nach einigen Sekunden bis Minuten, je nach verwendeter Zubereitung, die purpurne Farbe zurück und der Anfangszustand ist wiederhergestellt. Alternativ kann durch Bestrahlen mit Licht 5 einer Leuchtdiode mit einem Emissionsmaximum 10 im Blaubereich die purpurne Farbe sofort wiederhergestellt werden. Der technische Aufwand für die Prüfung ist minimal. Der Anwender kann mit dem bloßen Auge die Farbänderung verfolgen, der Messprozeß lässt sich aber auch maschinell durchführen.
- 15 Beispiel 2: Kopierschutz
- Ein Dokument 1, das ein erfindungsgemäßes Merkmal 2 enthält, bei dem eine bestimmte Menge lichtempfindlichen Bakteriorhodopsin-Materials, z.B. der Wildtypform des Bakteriorhodopsins, und ein Bakteriorhodopsin- 20 Material mit höherer Lichempfindlichkeit, z.B. der Bakteriorhodopsin-Variante D96N kombiniert eingesetzt werden, weist im unbelichteten Zustand eine einheitliche Fläche gleicher Färbung auf (Abbildung 2). Statt des unempfindlichen Bakteriorhodopsin-Materials kann auch ein geeigneter Farbstoff gleicher Färbung verwendet werden. Wird dieses 25 Dokument mit Hilfe eines Photokopierers 3 vervielfältigt, so wird durch die Bestrahlung mit Licht während des Kopievorgangs das lichtempfindliche Bakteriorhodopsin-Material stärker gebleicht als das umgebende Material geringerer Lichempfindlichkeit. Deshalb wird die Kopie 4 ein Niedrigsicherheitsmerkmal 5 aufweisen, bei dem dauerhaft das Merkmal 30 seine unterschiedliche Färbung behalten wird. Hieran wird die Kopie eindeutig als Kopie zu erkennen sein.

- 31 -

Beispiel 3: Nachträgliche Behandlung, Hilfsstoffe und Applikationsverfahren

a) Nachträgliche Quervernetzung

Ein Substrat mit einer getrockneten photochromen Schicht, bestehend aus dem Matrixmaterial und dem Bakteriorhodopsin, wurde für 15 Minuten mit einer 40% Glutardialdehydlösung überschichtet. Danach wurde die Glutardialdehydlösung mit Wasser abgewaschen. Die photochrome Schicht ist durch die Behandlung wasserunlöslich geworden.

b) Photochemisch

10 mg Purpurmembran (BR-D96N) wurden in 4 ml einer UV-härtenden Farbe (IFS3000, Fa. Schmitt) fein verteilt. Nach Applikation der Mischung mittels einer Rakel erfolgte die Aushärtung über Nacht unter UV-Licht.

c) Applikation

Siebdruck

Das Prinzip des Siebdrucks ist Durchdruck, ähnlich einer Schabloniertechnik. Die Druckform besteht aus einem Siebgewebe, welches mit einer farbundurchlässigen Sperrsicht versehen wird. Das Druckmotiv bleibt offen. Der Druck erfolgt durch das Abziehen des mit Farbe gefüllten Siebes mit einer Rakel. Die Farbe wird dabei auf das darunterliegende Substrat übertragen. Zur Herstellung einer Siebdruckfarbe wurden in eine 7,2% PVA-Lösung (Mowiol Typ 56-98) 100 mg/ml Pigment (Bakteriorhodopsin-Wildtyp) über Nacht eingerührt. Bei Übereinstimmung der rheologischen Eigenschaften mit einer Standardprobe

- 32 -

konnte die erhaltene Mischung mit einer herkömmlichen Siebdruckmaschine verdrückt werden.

Offsetdruck

5 In 5 ml einer Farbe ohne Pigment (Fa. Schmitt, IUF01) wurden bei 50°C 1 g Purpurmembran (BR-D96N) eingerührt. Die so erhaltene Mischung konnte mittels gängiger Offset-Technik verdrückt werden.

10 d) Mechanischer Schutz

Laminieren

15 Die auf ein Substrat applizierte photochrome Mischung, die Bakteriorhodopsin enthält, wurde mit einem Heißlaminiergerät (GPM, Mylam 9) mit einer Folientasche vom Typ GHQ-120TR bei einer Temperatur von 90 - 140°C einlaminiert.

e) Hilfsstoffe

Vermeidung der Schaumbildung

20 PVA (Typ Mowiol 56-98, 68 mg/ml) wurde bei 50°C in Wasser gelöst. Zu dieser Mischung wurde Purpurmembran in gefriergetrockneter Form hinzugegeben, so dass eine Konzentration von 11 mg/ml erhalten wurde. In diese Mischung wurde bei Raumtemperatur 1-Octanol (1% (V/V)) untergerührt. Die so erhaltene Mischung hatte verbesserte Eigenschaften beim Druckauftrag bezüglich der Blasenbildung.

Abschirmung von UV-Strahlung

30 Zum Schutz des photochromen Pigments wurde die Mischung mit einem der folgenden UV-Absorber oder einem Derivat davon in Konzentration von 1 - 30%,

- 33 -

bevorzugt 3 - 10% w/w versetzt: Benzophenon, Hydroxynaphthochinon, Phenylbenzoxazol, Zimtsäureester, Sulfonamid, Aminobenzoësäureester.

5 Beispiel 4

Ein Gebrauchsdocument wie z.B. ein Geldschein, der mit der Bakteriorhodopsin enthaltenen Sicherheitsmarkierung versehen ist. Bei Belichtung verändert die Sicherheitsmarkierung ihre Farbe von Violett nach 10 Gelb. Nach einer kurzen Zeit (ca. 30 - 60 s) und/oder bei Belichtung mit Licht des blauen Wellenlängenbereichs kehrt die ursprünglich violette Farbe wieder zurück. Ein solches Gebrauchsdocument wäre gegen eine 20 unerlaubte Vervielfältigung bzw. eine Fälschung gesichert.

15 Beispiel 5

Wie Beispiel 4, es erfolgt jedoch unter Belichtung mit Licht des blauen Wellenlängenbereichs ein Farbwechsel von Gelb nach Violett. Nach der Belichtung kehrt die ursprüngliche Farbe durch das Umgebungslicht 20 zurück.

Beispiel 6

Ein Dokument, wie z.B. ein Vertrag, der mit einem violetten Balken 25 versehen ist. Dieser Balken wird durch zweimaliges Drucken mit zwei Schablonen, die sich wie Positiv und Negativ verhalten, hergestellt. Durch die Verwendung dieser beiden Schablonen ist es möglich, zwei 30 Farbzubereitungen zu verwenden, die sich in ihrer Lichtsensitivität unterscheiden. Bei Belichtung mit Weißlicht verfärbt sich die lichtsensitivere Schicht von Violett nach Gelb, während die andere Schicht sich nicht verfärbt oder nur sehr schwach verfärbt. Dabei entsteht ein Farbkontrast. Damit ist es möglich, aus der vorher homogenen Fläche ein

- 34 -

Wort (z.B. Original) oder jede beliebige andere Zeichenfolge und/oder Piktogramme hervorzuheben.

Beispiel 7

5

Wie 6, es wird jedoch auf normales bzw. Photopapier gedruckt, das hinterher einlaminiert werden kann. An einem Markenartikel (Kleidungsstücke, wie z.B. Jeans o. ä.) befestigt bzw. als Beigabe zu einem Markenartikel, kann es dann dessen Authentizität sicherstellen und somit 10 Produktpiraterie vorbeugen.

Beispiel 8

Um ein Dokument vor der unerlaubten Vervielfältigung durch Kopieren zu schützen, wird wie bei 6 mit zwei Schablonen eine homogen erscheinende Fläche erzeugt. Ein Teil der homogenen Fläche vollzieht beim 15 Kopieren einen Farbwechsel, so dass die Kopie durch eine inhomogene Fläche gekennzeichnet ist.

- 35 -

Ansprüche

1. Verfahren zur Sicherung der Authentizität eines Gegenstandes durch Applizieren einer photochromen Tinte auf den Gegenstand, wobei man eine photochrome Tinte verwendet, die mindestens eine Bakteriorhodopsin-Variante als photochromen Anteil enthält, welche bei Bestrahlung mit Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich eine visuell detektierbare, als Niedrigsicherheitsmerkmal bei einer Authentizitätsprüfung nutzbare reversible Zustandsänderung erfährt und die zusätzlich zu dem Niedrigsicherheitsmerkmal ein oder mehrere visuell nicht detektierbare, nur mit instrumenteller Analytik nachweisbare Hochsicherheitsmerkmale aufweist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Bakteriorhodopsin-Variante ausgewählt wird aus Funktionsvarianten, Sequenzvarianten, Derivatisierungsvarianten, Chromophorvarianten, Isotopenvarianten oder/und Spin-Label-Varianten.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass eine Bakteriorhodopsin-Variante verwendet wird mit den Merkmalen:
 - a) der zur Ausbildung der Purpurmembran-Form des Proteins notwendige Bereich ist gegenüber dem Bakteriorhodopsin-Wildtyp unverändert,
 - b) in Schleifen oder/und dem C-Terminus oder/und dem N-Terminus der Polypeptidkette ist mindestens ein Aminosäure-Austausch gegenüber dem Bakteriorhodopsin-Wildtyp vorhanden, umfassend Deletionen, Additionen, Insertionen oder/und Substitutionen, wobei diese Aminosäure-Austausche nicht zu einer Änderung der durch den photochromen Bereich bestimmten photochromen Eigenschaften des Bakteriorhodopsins führen.

- 36 -

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass eine Bakteriorhodopsin-Variante verwendet wird, bei der am C-Terminus mindestens eine Aminosäure addiert ist.
5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Bakteriorhodopsin-Variante mindestens ein Cystein enthält.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die verwendete Bakteriorhodopsin-Variante einen vom Wildtyp verschiedenen Photozyklus oder und eine vom Wildtyp verschiedene Anfangsfarbe besitzt.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass eine BR-Variante ausgewählt aus D36C, D96N und D85N verwendet wird.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die photochrome Tinte ein weiteres polymeres Molekül umfasst.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass eine Bakteriorhodopsin-Variante verwendet wird, bei der ein polymeres Molekül an Bakteriorhodopsin gekoppelt ist.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das polymere Molekül ein Polypeptid ist, das gegebenenfalls Nicht-Peptid-Anteile aufweist.
11. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das polymere Molekül Nukleinsäuren oder/und Derivate davon umfasst, die gegebenenfalls Nicht-Nukleinsäure-Anteile aufweisen.

- 37 -

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die an das Bakteriorhodopsin gekoppelten Nukleinsäuren und/oder deren Derivate durch geeignete Amplifikationsreaktionen detektiert werden.
- 5
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Sequenz der Amplifikationsprodukte bestimmt wird.
- 10
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die photochrome Zubereitung mindestens zwei Bakteriorhodopsin-Varianten oder/und eine Bakteriorhodopsin-Variante mit mindestens zwei Modifikationen umfasst.
- 15
15
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass weiterhin Hilfsstoffe eingesetzt werden
 - a) zur Vermeidung der Schaumbildung und zur Verbesserung der Benetzungseigenschaften oder/und
 - b) zur Mikroverkapselung der Materialien der Tinte und zur Abschirmung von UV-Strahlen zur Erhöhung der Stabilität oder/und
 - c) zur Beeinflussung des Absorptionsspektrums von Bakteriorhodopsin-Material zur Verbesserung des visuellen optischen Eindrucks.
- 20
25
25
16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass weiterhin Matrixmaterialien eingesetzt werden zur Fixierung des photochromen Materials durch
 - a) physikalischen Einschluss oder/und
 - b) kovalente Kopplung an das Matrixmaterial oder/und
 - 30
c) Quervernetzung.

- 38 -

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Bakteriorhodopsin-Variante in einer mittels UV-Licht aushärtbaren Farbe fein verteilt wird und die Quervernetzung durch Bestrahlung mit UV-Licht erfolgt.

5

18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die photochrome Zubereitung selbst oder ein Hilfssubstrat, auf dem die Tinte aufgebracht ist, auf den Gegenstand appliziert wird.

10

19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass auf dem zu markierenden Gegenstand zwei insbesondere aneinandergrenzende Flächen A und B appliziert werden, wobei die erste Fläche A mit der Bakteriorhodopsin enthaltenden photochromen Zubereitung markiert wird, und das zweite Feld B mit einem nichtphotochromen Farbstoff versehen wird, dessen spektrale Remission sich im unbelichteten Zustand nicht von der des ersten Feldes unterscheidet, aber nach der Belichtung eine gegenüber dem ersten Feld unterschiedliche Remission zeigt.

15

20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei auf dem zu markierenden Gegenstand zwei insbesondere aneinander-grenzende Flächen A und B appliziert werden, wobei das erste Feld mit einer ersten Bakteriorhodopsin enthaltenden photochromen Zubereitung markiert wird, und das zweite Feld mit einer zweiten photochromen Zubereitung versehen wird, deren Lichtempfindlichkeit sich von der der ersten unterscheidet, so dass sich das zweite Feld im unbelichteten Zustand in seiner spektralen Remission nicht von dem ersten Feld unterscheidet, aber nach der Belichtung eine gegenüber dem ersten Feld unterschiedliche Remission zeigt.

25

30

- 39 -

21. Photochrome Tinte, dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens eine Bakteriorhodopsin-Variante enthält.
22. Gegenstand, markiert gemäß einem Verfahren nach einem der 5 Ansprüche 1 bis 20.
23. Verfahren zur Sicherung der Authentizität eines Gegenstandes durch Applizieren einer photochromen Tinte auf den Gegenstand, wobei man eine photochrome Tinte verwendet, die Bakteriorhodopsin-Wildtyp als photochromen Anteil enthält, welcher bei 10 Bestrahlung mit Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich eine visuell detektierbare, als Niedrigsicherheitsmerkmal bei einer Authentizitätsprüfung nutzbare reversible Zustandsänderung erfährt und die weiterhin einen Hilfsstoff enthält, welcher Wasser bindet oder/und die Protonenverfügbarkeit reduziert. 15

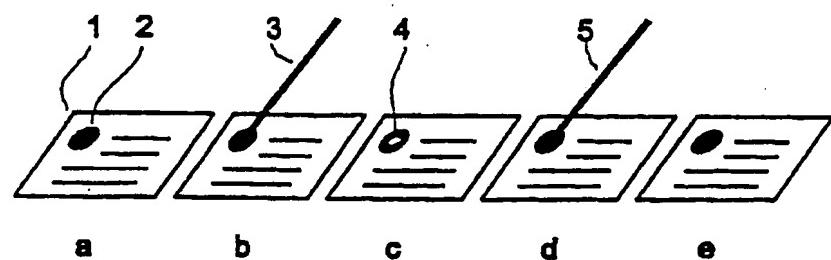


Fig. 1

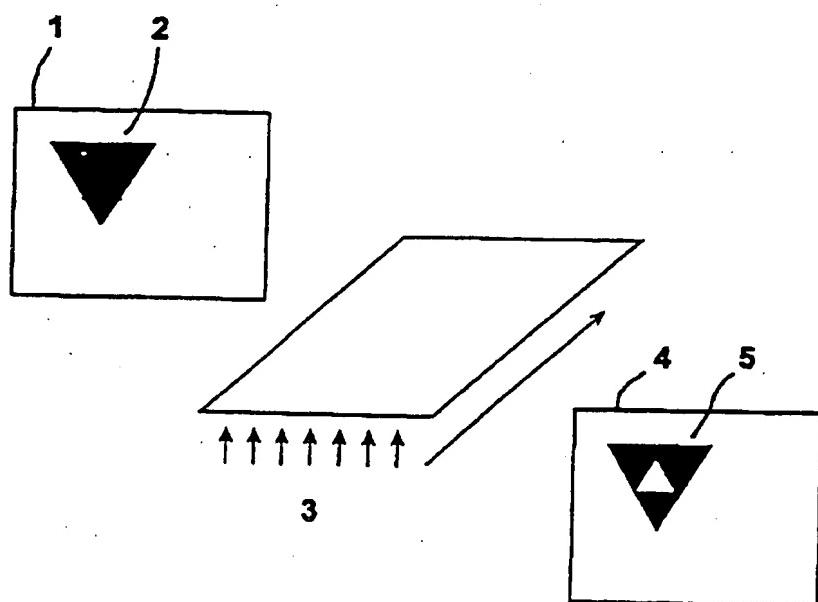


Fig. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/02905

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | | | | |
|-------------------------------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| IPC 7 | B41M3/14 | G07D7/00 | B42D15/00 | B42D15/10 | C09D11/00 |
| | C09K9/02 | C09K11/06 | G09F3/00 | | |

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 B41M G07D B42D C09D C09K G09F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X | DE 195 14 247 A (A.BÜRKHOLZ) 17 October 1996 (1996-10-17) column 1, line 34 - line 55 column 2, line 21 - line 23 claims 1,6 A column 2, line 21 - line 50 | 21 |
| A | WO 98 06084 A (BEIJING SANZHU XINDA BIOLOGICAL PROBE COMPANY LIMITED) 12 February 1998 (1998-02-12) cited in the application * Abstract * | 1-20, 22, 23 |
| | | 1-23 |

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the International filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

30 May 2000

Date of mailing of the International search report

07/06/2000

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bacon, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|------------------------------|
| International Application No |
| PCT/EP 00/02905 |

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
| A | <p>D.WEBER ET AL.: "Novel implementation of nonlinear joint transform correlators in optical security and validation" OPTICAL ENGINEERING., vol. 38, no. 1, January 1999 (1999-01), pages 62-68, XP000822176 SOC. OF PHOTO-OPTICAL INSTRUMENTATION ENGINEERS. BELLINGHAM, US ISSN: 0091-3286 page 62, line 1 - line 25 <u>Zusammenfassung</u> page 64, line 34 -page 65, line 83</p> <hr/> <p>US 5 807 625 A (A.AMON ET AL.) 15 September 1998 (1998-09-15) <u>cited in the application</u> column 2, line 60 -column 3, line 33 column 6, line 40 -column 7, line 22 <u>claims 1-26; examples 1-17</u></p> <hr/> | 1-23 |
| A | | 1-23 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/02905

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|--|------------------|--|--|--|
| DE 19514247 | A 17-10-1996 | NONE | | |
| WO 9806084 | A 12-02-1998 | CN AU | 1148227 A 3764897 A | 23-04-1997 25-02-1998 |
| US 5807625 | A 15-09-1998 | CA US AT DE DE EP GB JP JP | 1340078 A 5630869 A 97685 T 3885880 D 3885880 T 0327788 A 2214191 A, B 1223181 A 2972216 B | 13-10-1998 20-05-1997 15-12-1993 05-01-1994 14-04-1994 16-08-1989 31-08-1989 06-09-1989 08-11-1999 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Klasse Altenzahlen
PCT/EP 00/02905

| A. KLASSEFIZIERTUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES | | | | | |
|--|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| IPK 7 | B41M3/14 | G07D7/00 | B42D15/00 | B42D15/10 | C09D11/00 |

C09K9/02 C09K11/06 G09F3/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestpräfix (Klassifikationssystem und Klassifikationsasymbole)
IPK 7 B41M G07D B42D C09D C09K G09F

Recherchierte aber nicht zum Mindestpräfix gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X | DE 195 14 247 A (A.BÜRKHOLZ) 17. Oktober 1996 (1996-10-17) Spalte 1, Zeile 34 – Zeile 55 Spalte 2, Zeile 21 – Zeile 23 Ansprüche 1,6 Spalte 2, Zeile 21 – Zeile 50 | 21 |
| A | WO 98 06084 A (BEIJING SANZHU XINDA BIOLOGICAL PROBE COMPANY LIMITED) 12. Februar 1998 (1998-02-12) in der Anmeldung erwähnt * Abstract * | 1-20,22, 23 |
| A | | 1-23 |

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieses Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

| | |
|--|---|
| Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche | Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts |
| 30. Mai 2000 | 07/06/2000 |
| Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | Bevollmächtigter Bediensteter Bacon, A |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

| | |
|------------------------|------------------------|
| Intern Referenz-Nr. | nationale Aktenzeichen |
| PCT/EP 00/02905 | |

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEBEHNE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| A | <p>D.WEBER ET AL.: " "Novel implementation of nonlinear joint transform correlators in optical security and validation"" OPTICAL ENGINEERING., Bd. 38, Nr. 1, Januar 1999 (1999-01), Seiten 62-68, XP000822176 SOC. OF PHOTO-OPTICAL INSTRUMENTATION ENGINEERS. BELLINGHAM, US ISSN: 0091-3286 Seite 62, Zeile 1 - Zeile 25 Zusammenfassung Seite 64, Zeile 34 -Seite 65, Zeile 83</p> <hr/> | 1-23 |
| A | <p>US 5 807 625 A (A.AMON ET AL.) 15. September 1998 (1998-09-15) in der Anmeldung erwähnt Spalte 2, Zeile 60 -Spalte 3, Zeile 33 Spalte 6, Zeile 40 -Spalte 7, Zeile 22 Ansprüche 1-26; Beispiele 1-17</p> <hr/> | 1-23 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

| | |
|-----------------|-------------------|
| Intern | ales Aktenzeichen |
| PCT/EP 00/02905 | |

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|---|-------------------------------|---|--|
| DE 19514247 | A | 17-10-1996 | KEINE | |
| WO 9806084 | A | 12-02-1998 | CN 1148227 A AU 3764897 A | 23-04-1997 25-02-1998 |
| US 5807625 | A | 15-09-1998 | CA 1340078 A US 5630869 A AT 97685 T DE 3885880 D DE 3885880 T EP 0327788 A GB 2214191 A, B JP 1223181 A JP 2972216 B | 13-10-1998 20-05-1997 15-12-1993 05-01-1994 14-04-1994 16-08-1989 31-08-1989 06-09-1989 08-11-1999 |